

- [6] Cavallo, T.; Sade, R.; Folkman, J.; Cotran, R. S.; *J. Cell Biol.* 54: 408—420, 1972.
- [7] Flokman, J., Merler, E., Abernathy, C.; Williams, G., *J. Exp. Med.* 133: 275—288, 1971.
- [8] Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P. R., Forand, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 5674—5678, 1979.
- [9] Laemmli, U. K., *Nature*, 227: 680—685, 1970.
- [10] 盛国立等,《上海医科大学学报》第14卷,第一期,71—73, 1987.
- [11] Gimbrone, M. A. Jr., 1976, New York. Grune and Stratton 3: 1—28.
- [12] Gimbrone, M. A. Jr. and Cotran, R. S., 1975, *Lab. Invest.*, 33: 16—27.
- [13] Maruyama, Y. 1963, *Mikrosk. Anat.*, 60: 69.
- [14] Jaffe, E. A. et al., 1973. *J. Clin. Invest.*, 52: 2745.
- [15] Gordon, P. B. et. al. 1983. *In Vitro*. 19: 661.
- [16] 何红兵等,《第一军医大学学报》,9(4): 236, 1988.
- [17] 魏少敏等,中国病理生理杂志,3(3): 188, 1987.
- [18] 梁明达等,昆明医学院学报,2:1, 1988.

γ-干扰素对人大肠癌细胞系的生长抑制作用和对细胞周期的影响

王 聆 戴人杰 周光炎
(上海市免疫学研究所 200025)

刘新垣
(中国科学院上海生物化学研究所)

我们发现人大肠癌细胞倍 HLA 抗原异常表达和肿瘤细胞 DNA 含量(倍性)有关,而且 HLA 抗原的表达率愈高则肿瘤转移率愈低^[1]。为了了解 HLA 抗原表达与肿瘤生长增殖及预后的内在联系,我们还用 r 干扰素(IFN γ)在体外成功地诱导了三株大肠癌细胞系使其 HLA 抗原及癌胚抗原(CEA)表达增强^[2]。在此基础上,本文进一步测定肿瘤生长增殖状态和细胞周期的分布,目的是揭示与肿瘤细胞 HLA 抗原表达相关的某些因素间的变化的规律及意义,为肿瘤免疫治疗提供依据。

材 料 与 方 法

一、人大肠癌细胞系 LoVo(结肠癌,引自美国 ATCC), HR 8348(直肠癌)和 HCl(结肠癌)。后两者由浙江省肿瘤所建系^[3]。

二、IFN 抑制实验 将 LoVo、HR 8348 和 HCl 分别以每孔 10^3 、 10^4 和 10^5 细胞数加入 96 孔平底细

胞培养板,细胞贴壁生长 24 小时后,各孔加入含基因重组 IFN γ (中科院生化所制)的培养液 0.3 ml,浓度依次为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 U/ml,对照孔加无 IFN γ 的培养液,再培养 48 小时后检测 IFN γ 的抑制作用。另用 IFN $\gamma 10^3$ U/ml 分别与细胞培养 24、48、72 和 96 小时,观察 IFN γ 作用的时间效应。

三、同位素掺入 肿瘤细胞经 IFN γ 作用后,吸去培养液,各孔中加入不含 IFN γ 的培养液 0.2 ml 和 3 H-TdR(上海原子核所,比度 23 mCi/ml)0.5 uCi。实验对照未经 IFN γ 培养孔,空白对照为无细胞孔。37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 培养 4 小时后, Hanks 液洗板,各孔用 0.1 N KOH 0.1 ml 和 5%三氯醋酸 0.1 ml 处理,收集细胞,β 液闪仪测各孔 cpm 值,并计算生长抑制率:

$$\text{生长抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{加 IFN}\gamma \text{ 孔 cpm 值} - \text{空白对照孔 cpm}}{\text{不加 IFN}\gamma \text{ 孔 cpm 值} - \text{空白对照孔 cpm}} \right) \times 100\%$$

细胞 DNA 含量测定承上海肿瘤医院曹世龙教授领导的 FCM 实验室大力协助,谨致谢意。

四、细胞DNA含量测定 IFN γ 培养的肿瘤细胞

用1% TritonX-100室温下处理10分钟, PBS洗后, 经RNase液消化及碘化丙啶染色, 室温放置30分钟, 流式细胞仪EPICS γ (Coulter公司)测定DNA含量并分析细胞周期分布, 激发光波长488 nm, 发射光波长600 nm, 测定内标准为鸡红细胞。

结 果

未加IFN γ 培养孔 ^3H -TdR掺入值(cpm)分别是: LoVo, 5291 ± 206 ; HR 8348, 2649 ± 314 ; HCl, 5059 ± 512 , 可见HR 8384为慢增殖细胞。

图1是不同浓度的IFN γ 对三株肿瘤细胞生长抑制作用曲线。图2是相同浓度IFN γ (10^3

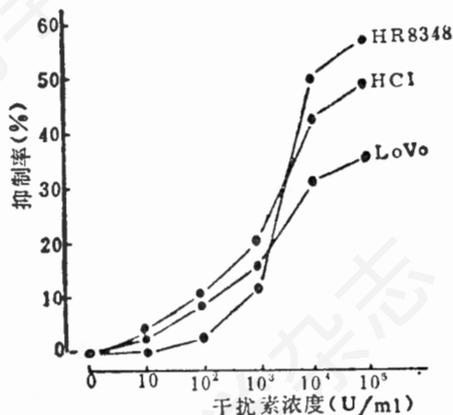


图1 IFN γ 对人大肠癌细胞系生长抑制作用的剂量效应

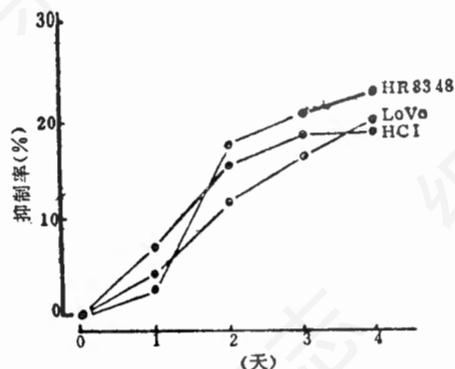


图2 IFN γ 对人大肠癌细胞系生长抑制作用的时间效应

U/ml)经不同时间培养后对肿瘤细胞生长抑制作用曲线。无论是增高IFN γ 的浓度或延长其作用时间, 对3株细胞均表现出愈为明显的抑制效应, 即抑制百分率的增高。

未经IFN γ 作用时, 三株细胞的细胞周期分布已见差异, HR 8348的S期和G₂/M期细胞比例均为最高, 而LoVo较接近于正常二倍体细胞的分布(表1)。经IFN γ 10^3 U/ml培养不同时间后, 细胞周期分布均发生了改变, 如表1所示, 与未经IFN γ 作用的细胞比较, 均表现为G₀/G₁期细胞比例减少, S期细胞比例增高, G₂/M期则变化甚小。这种细胞比例的改变在一定范围内随IFN γ 培养时间的延长而更为明显, 但变化程度在三株细胞中并不一致, 以LoVo最大(图3)。

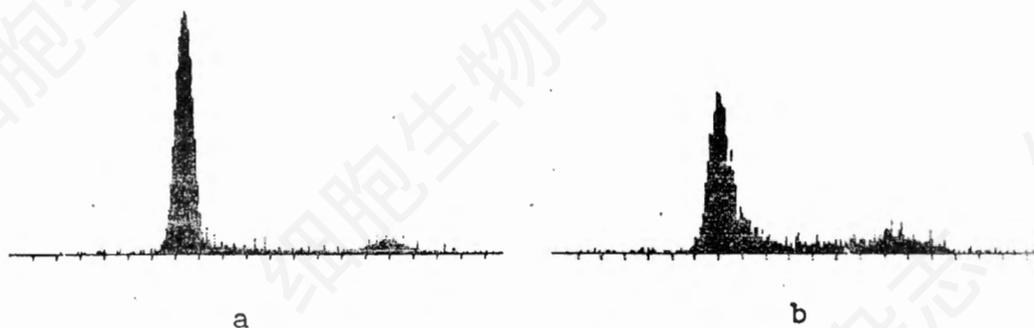


图3 IFN对LoVo细胞周期影响的时间效应

a: IFN(-), G₀/G₁: 79.26%, S: 9.35%, G₂/M: 11.39%
 b: IFN 10^3 U/ml 72 hr, G₀/G₁: 58.01%, S: 27.57%, G₂/M: 14.42%

表1 IFN γ 对大肠癌细胞系细胞周期的影响

	IFN γ 时间(h)	细胞分布(%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
LoVo	0	79.26	9.35	11.39
	72	58.01	27.57	14.42
HCl	0	57.76	26.19	16.05
	48	51.29	30.06	18.64
	96	44.36	37.56	18.08
HR 8348	0	34.47	31.47	34.07
	120	26.09	40.08	34.82

讨 论

IFN对细胞的生长抑制作用已较明确^[3,4],本文目的是基于IFN诱导三株大肠癌细胞HLA抗原表达增强的结果上,进一步分析在IFN γ 同一作用条件下,细胞增殖状态和细胞周期改变的关系。

结果表明,IFN γ 对三株细胞均产生直接的抑制生长增殖作用,以原为慢增殖细胞的HR 8348最甚(抑制百分率最高)。IFN γ 的抑制作用随其剂量的增高,作用时间的延长而增强。另一方面,IFN γ 使三株细胞的细胞周期发生改变,即G₀/G₁期细胞比例减少,S期比例增高,并随作用时间延长而明显。由于细胞均为被抑制状态,S期的增高并非DNA合成代谢旺盛,细胞生长活跃,而只意味着IFN γ 可能抑制了细胞周期某一或多个环节,造成细胞在S期堆积,这种堆积作用很可能是短暂的,应用流式细胞仪检测,可以判断该种堆积作用的持续时间,以及可以定量地计算在该阶段每一单位药物所致的细胞DNA合成抑制情况。近年来,由于流式细胞仪的应用,对这一现象渐有发现,已有报道IFN α 和IFN β 可使G₁期细胞减少,S期细胞堆积^[5-7]。本实验证实,IFN γ 亦具有类似作用,应用IFN γ 10³U/ml对细胞生长仅产生较轻度抑制作用时,对细胞周期的影响已较明显,因此这种影响可能是反映细胞增殖受抑制的一个

早期和敏感的指标,如果这一结论确立,对IFN的临床治疗效果监测和对IFN的细胞生物学效应的研究是一条可望深化的途径。

从本实验结果中尚无法得出细胞生产抑制程度与细胞周期改变程度之间的相互关系,因为IFN γ 对LoVo细胞的抑制作用最轻,但对细胞周期中细胞比例改变的影响最大。所以是否可以G₀/G₁和S期细胞比例改变的程度直接反映细胞生长抑制的强度还需进一步的实验依据。结合另文结果^[2],IFN γ 在抑制细胞增殖的同时又诱导了HLA抗原的表达,对于二者关系的分析和研究正在深入研究。

摘 要

用人基因重组 γ 干扰素与三株人大肠癌细胞系LoVo、HR 8348、和HCl培养后,细胞呈现抑制性生长,细胞在细胞周期中的分布也同时发生改变,表现为G₀/G₁期细胞比例减少,S期细胞比例增高。细胞生长的抑制和细胞周期的改变随 γ 干扰素剂量增大(10—10⁶U/ml)及作用时间延长(24—96小时)而增强。细胞在S期的堆积是细胞生长抑制的原因之一。

参 考 文 献

- [1] 王 聆等, 中华肿瘤杂志, 发表中(已接受)。
- [2] 王 聆等, 中华微生物学和免疫学杂志, 已接受发表。
- [3] Balkwill F. R. et al., 1982. *Int. J. Cancer*, 30: 231.
- [4] Hamburger, A. W. et al., 1988, *Br. J. Cancer*, 58: 147.
- [5] Lin, S. L. et al., 1986, *Science*, 333: 256.
- [6] Finat, M. et al., 1985, *Nature*, 313: 597.
- [7] Genka, S. et al., 1988. *J. Neuro-Oncology*, 6: 299.
- [8] 张宗显等, 1986, 中国科学(B辑), 11: 1197.